

氧化石墨烯装载白藜芦醇用于多种肺腺癌细胞的体内外治疗

熊慧生, 蒋参, 文军, 夏兴梅
重庆市肿瘤研究所中医科, 重庆 400030

【摘要】目的:制备装载白藜芦醇(Resveratrol, RV)的氧化石墨烯(Graphene Oxide, GO)纳米颗粒并用于人肺腺癌细胞的体内外治疗研究。**方法:**紫外分光光度计检测GO装载RV前后的紫外吸收光谱;原子力显微镜和纳米粒度分析仪检测纳米颗粒的表面形态和粒径大小;细胞活性检测试剂盒CCK-8检测纳米颗粒对A549细胞活性的影响;最后构建小鼠肿瘤模型,并研究纳米药物对肿瘤的治疗效果。**结果:**制备GO装载的RV颗粒(NGO-RV)为片层纳米结构,平均粒径大小为98 nm。在pH为5.0时,RV的释放量达到最大。NGO-RV对A549、NCI-H358细胞的抑制作用具有浓度和时间依赖性,明显比单独的RV细胞抑制作用大。在体治疗实验发现,NGO-RV具有显著的A549肿瘤抑制作用。**结论:**本实验成功制备的NGO-RV药物,在体内外的肿瘤治疗中发挥显著效果。

【关键词】氧化石墨烯;白藜芦醇;人肺腺癌;A549;NCI-H358细胞;肿瘤治疗

【中图分类号】R318.08;R979.1

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2017)06-0644-05

Preparation of graphene oxide loaded with resveratrol for *in vitro* and *in vivo* therapy of several human lung adenocarcinoma cells

XIONG Huisheng, JIANG Can, WEN Jun, XIA Xingmei

Department of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Institute of Cancer Research, Chongqing 400030, China

Abstract: Objective To prepare the graphene oxide (GO) loaded with resveratrol (RV), namely nanoparticle GO-RV (NGO-RV), for *in vitro* and *in vivo* therapy of human lung adenocarcinoma cells. **Methods** UV-VIS spectrophotometer was used to test the absorbance spectra of GO before and after being loaded with RV. Atomic force microscopy and Naosizer were used to detect the morphology and diameter of the prepared NGO-RV. The effects of NGO-RV on the A549 cell viability were tested with the cell counting kit-8. Finally, we established the mouse tumor model for evaluating the therapeutic effect of prepared NGO-RV for tumor *in vivo*. **Results** The prepared NGO-RV contained nanostructure (lamellar) and about 98 nm in average diameter, and the RV release amount reached maximum when the pH value was 5.0. Compared with RV, NGO-RV showed a significantly larger inhibition on the cell viability of A549 and NCI-H358 cells, with concentration and time dependence. In the *in vivo* experiment, NGO-RV exhibited obvious A549 tumor suppression. **Conclusion** We successfully prepare NGO-RV which is significant for *in vitro* and *in vivo* therapy of tumor.

Keywords: graphene oxide; resveratrol; human lung adenocarcinoma; A549; NCI-H358 cells; tumor therapy

前言

氧化石墨烯(Graphene Oxide, GO)是石墨烯的主要衍生物,为二维的碳纳米材料^[1-2]。由于其连有羟基、羰基、羧基等亲水性官能团,故在生物环境中的分散性能较好,这样可以解决单独给药时药物极易团聚的缺点^[3-4]。这些官能团还可以通过共价键连接一些功能分子,如荧光染料小分子FITC等^[5]。此外,GO表面含有丰富的 π - π 共轭结构,可以通过 π - π

堆积力吸附芳香烃类小分子^[6]。张龙姣等^[7-8]利用GO去装载常用的抗癌药物阿霉素,得到阿霉素的纳米药物,并作用于肿瘤细胞,取得很好的肿瘤治疗效果。另外,其缓释性及高载药量等特性使得药效显著提高,减小了高浓度药物对机体的不良反应^[9-10]。

白藜芦醇(Resveratrol, RV)是多酚类化合物,主要来源于葡萄、虎杖、花生、桑椹等植物^[11-12]。它是一种生物性很强的天然多酚类脂溶性药物,是肿瘤的化学预防剂,也是对降低血小板聚集,预防和治疗动脉粥样硬化、心脑血管疾病的化学预防剂^[13]。近年来,RV实验研究已经证实其对心血管疾病和癌症有很好的治疗效果^[14]。

【收稿日期】2017-02-11

【基金项目】重庆市卫生和计生委中医药科技项目(ZY20150241)

【作者简介】熊慧生,男,副主任医师,E-mail:3181666167@qq.com

本研究中,我们制备了纳米级别的GO,并通过 π - π 堆积作用力吸附抗癌药物RV,得到RV纳米药物,从而提高RV的水溶性并具备缓释作用。制备的纳米药物用于小鼠肺腺癌体内体外治疗。

1 方法

1.1 实验材料

GO片(货号:55147007)购买于上海甄准生物科技有限公司;RV粉末(HPLC 98%)购买于西安冠宇生物技术有限公司;CCK-8细胞活性检测试剂盒(Dojindo Laboratories)购买于东仁化学科技(上海)有限公司;DMEM细胞培养液(Invitrogen)购买于上海康稳生物科技有限公司。

1.2 实验仪器

紫外分光光度计(THERMO, USA)购买于上海辅泽商贸有限公司;原子力显微镜(FM-Nanoview 6600AFM)购买于苏州飞时曼精密仪器有限公司;纳米粒度分析仪(N5)购买于美国贝克曼库尔特公司。

1.3 GO装载的RV颗粒(NGO-RV)的制备与表征

取一定量的GO分散在水中,在800 W的超声功率下超声30 min,使GO片层剥落,获得棕色的分散液,离心去除沉淀物即得到GO分散液。取5 mL的GO分散液,然后加入500 μ L RV的二甲基亚砜溶液(5 mg/mL)避光搅拌24 h,离心,取一定体积上层清液,紫外分光光度计测定其吸光度,利用事先绘制的药物浓度C吸光度标准曲线,算出离心上清液中药物的浓度,离心后的下层物质在真空干燥箱中30 $^{\circ}$ C下干燥,按 $(W_{\text{总}} - W_{\text{上清}})/W_{\text{总}}$ 计算GO的RV载药率。将制备得到的NGO-RV置于不同pH值(5.0、7.4、9.0)的溶液中,每隔一段时间计算其释放出来的RV量。原子力显微镜和纳米粒度分析仪检测NGO-RV的表面形貌和粒径分布。

1.4 细胞培养与活性检测

人肺腺癌A549、NCI-H358细胞购买于中国科学院上海细胞库,培养于含10%胎牛血清的DMEM培养液中,并放置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂恒温恒湿的培养箱中培养。取对数生长期的贴壁细胞,用消化液将细胞消化成细胞悬浮液,接种到96孔板中培养24 h。细胞浓度为10⁵个细胞/mL。然后加入不同浓度的纳米颗粒,继续培养24 h,去除旧培养液,再加入10% CCK-8试剂工作液继续放入培养箱中培养20 min,取出放到酶标仪中检测细胞的吸光值(OD 450 nm),OD 450 nm值与细胞活性成正比。

1.5 动物肿瘤模型

6~8周的balb/c小裸鼠24只,先放饲养间喂养1

周,然后在小鼠的后背皮下注射100 μ L A549细胞悬浮液(10⁶个细胞/mL),消毒处理后继续喂养7~10 d。观察肿瘤体积大小,并用游标卡尺测量肿瘤体积。肿瘤体积计算公式为 $V = \text{长} \times \text{宽} \times \text{宽} \div 2$ 。

1.6 肿瘤治疗

肿瘤体积达到100 mm³时,将A549瘤小鼠随机平均分为4组,分别为空白对照组、纳米氧化石墨烯(NGO)治疗组、RV治疗组、NGO-RV治疗组,每组6只小鼠。治疗期间每隔3 d测量一次小鼠的体质量和肿瘤体积,30 d治疗期结束后将小鼠处死,取出主要脏器(心肝脾肺肾),做HE病理切片染色,观察组织结构变化。

1.7 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件分析,数据用均数 \pm 标准差表示,各组间均数比较采用单因素方差分析;组内两两比较采用独立样本 t 检验分析。 $P < 0.05$ 表示具有统计学差异, $P < 0.01$ 表示具有显著统计学差异。

2 结果

2.1 NGO-RV的表征

如图1a所示,RV在波长306 nm处有一个特征吸收峰,而NGO仅在波长230 nm处有一个平缓的吸收峰。NGO连接上RV后,NGO在波长306 nm处出现一个很强的特征吸收峰,说明RV成功连接到NGO上。图1b为NGO-RV的原子力显微镜图,图片显示NGO-RV为纳米片层结构。如图1c所示,纳米粒度仪检测到NGO-RV的粒径分布在30~160 nm,平均粒径为98 nm。

2.2 RV的装载与释放

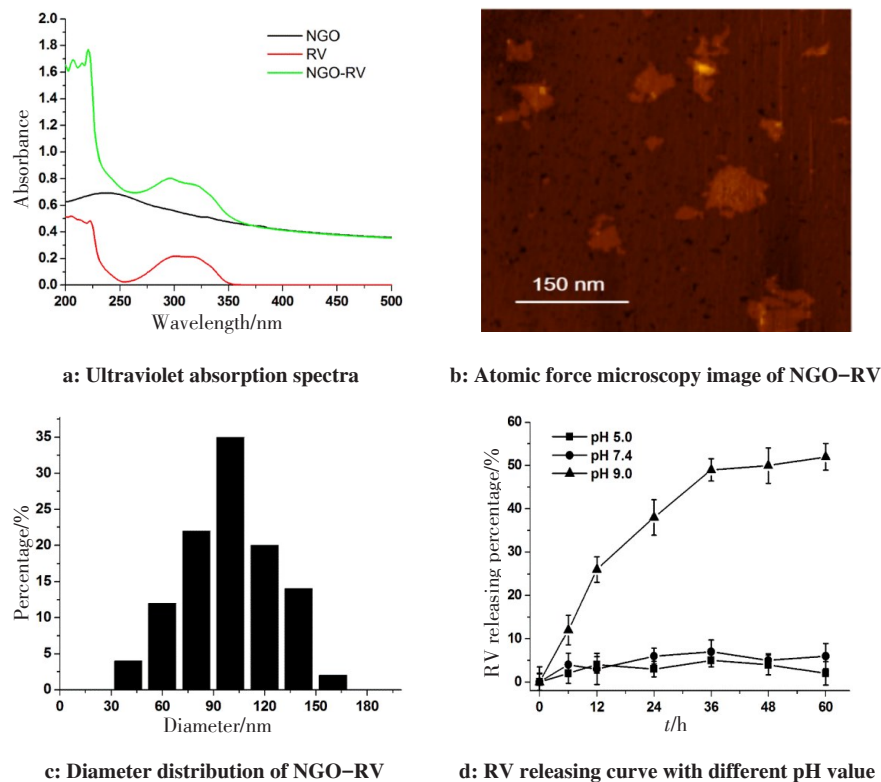
根据紫外吸收光谱检测结果以及朗伯比尔定律计算得出RV的装载率为89.0% \pm 3.6%。如图1d所示,RV在pH为5.0的溶液中释放速率最大,最高达52.3% \pm 2.8%,而在pH为7.4和9.0的溶液中释放速率较低。

2.3 NGO-RV对细胞活性的影响

如图2a和图2b所示,0~150 μ g/mL的NGO对A549、NCI-H358细胞的活性几乎没有影响,说明NGO对细胞的毒性很低。如图2c和图2d所示,NGO-RV引起A549、NCI-H358细胞活性显著降低,比单独的RV的A549、NCI-H358细胞活性抑制效果好。

2.4 NGO-RV在体肿瘤治疗

对于在体治疗试验,我们构建了A549细胞荷瘤小鼠模型。如图3a所示,NGO-RV可以显著抑制肿瘤体积的增长,而单独的RV和NGO治疗组中的肿瘤体积与空白对照组相比,均没有完全抑制肿瘤的生长。如图3b所示,在1个月的治疗期中,各个治疗组



NGO: Nanoparticle graphene oxide; RV: Resveratrol; NGO-RV: Nanoparticle graphene oxide loaded with resveratrol

图1 NGO-RV合成与表征

Fig.1 Synthesis and characterization of NGO-RV

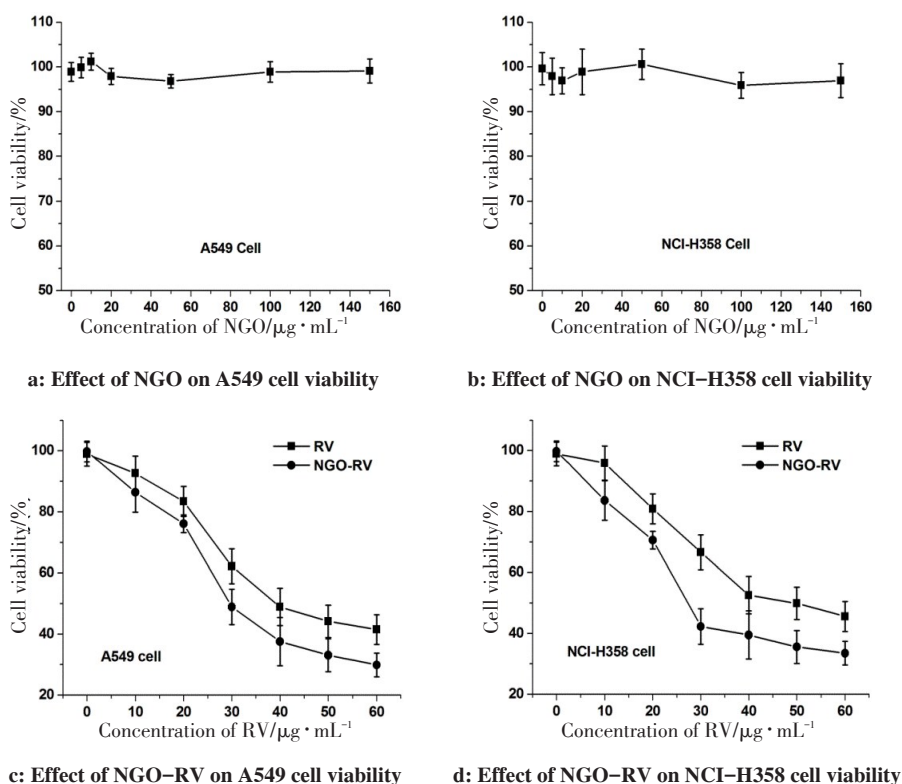


图2 NGO和NGO-RV对A549、NCI-H358细胞活性的影响

Fig.2 Effect of NGO and NGO-RV on A549 and NCI-H358 cell viability

的小鼠体质量也均没有发生明显降低。图3c为小鼠主要脏器的HE染色图片,与对照组的图片相比,各

治疗组脏器的组织结构均没有发生明显变化,说明NGO-RV对小鼠机体没有明显毒性。

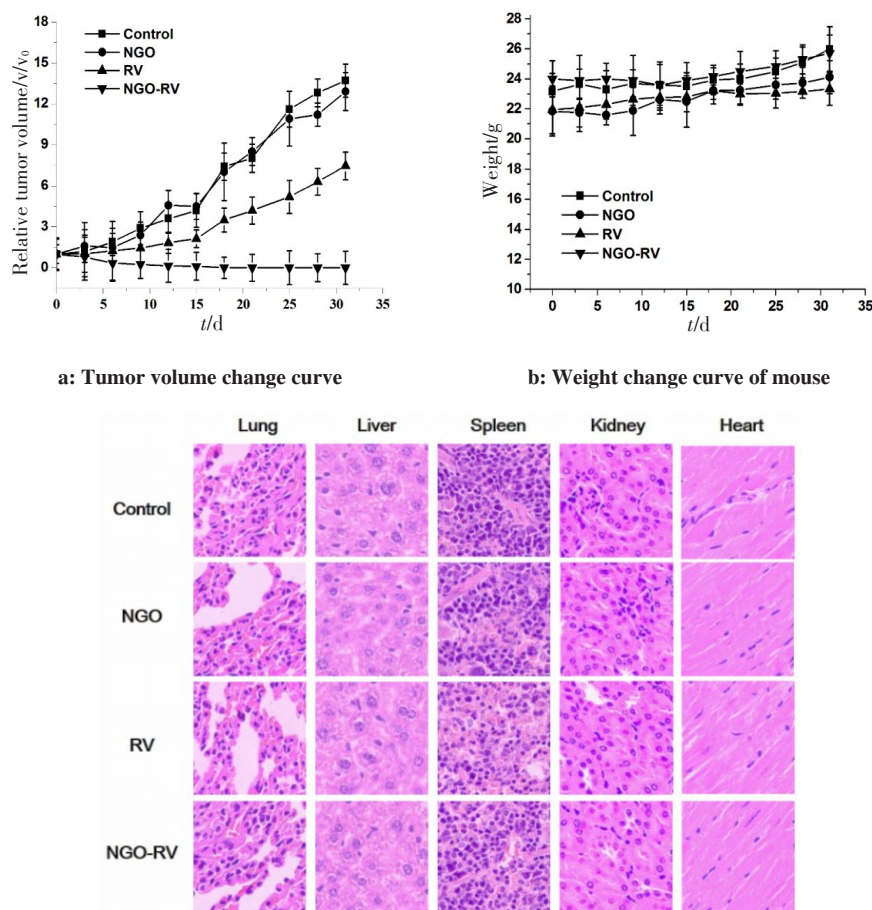


图3 肿瘤在体治疗(HE染色)

Fig.3 In vivo tumor therapy (HE staining)

3 讨论

GO是石墨烯经过化学反应后得到的重要复合物,其结构与石墨烯基本相同,只不过在石墨烯的表面有一些含氧的官能团,这些官能团以环氧基、羟基、羧基等官能团为主^[15-16]。有研究认为,GO胶体在水中能够具有良好分散性的原因是因为片层表面羧基和类酚羟基的电离使片层带有负电荷,产生静电排斥,从而在水中均匀分散^[17]。

非共价修饰是通过一些弱相互作用力,如 π - π 相互作用、离子键和氢键连接一些功能分子^[18]。Hollanda等^[19]利用聚乙酰亚胺对GO进行非共价修饰后,石墨烯材料在生理盐水及细胞培养液等环境下均有良好的稳定性,并能够有效地进行基因转染。黄毅等^[20]首先通过 π - π 堆积力非共价吸附1-苾甲基胺盐酸盐,然后通过氢键作用力将siRNA与1-苾甲基胺盐酸盐上的氨基进行连接,这样使GO形成一个多功能的复合体。近几年有研究表明,GO具有很好的载药能力,并可通过非共价键作用吸附芳香药物、负载疏水药物,对于水难溶性药物的剂型设计意义重大。

本研究中,我们制备纳米级别的GO颗粒并通过 π - π 堆积力吸附了脂溶性抗癌药物RV,原子力显微镜和纳米粒度分析仪均显示NGO-RV为100 nm左右的纳米片层结构颗粒。在pH为弱酸性条件下,RV可以缓慢从NGO表面释放出来,这个特性使得NGO-RV可以很好地应用到肿瘤治疗中,因为肿瘤内部为弱酸环境。体内体外肿瘤治疗实验表明,NGO-RV相比单独的RV可以显著抑制细胞活性和肿瘤生长,可能原因是NGO-RV进入肿瘤细胞中后,缓慢释放出RV,从而使药物长时间作用细胞。

综上所述,本研究成功制备的NGO-RV,并通过体内体外肺腺癌肿瘤治疗实验验证发现NGO-RV相比RV具有更好的肿瘤治疗效果。

【参考文献】

- [1] 刘智明, 郭周义. 氧化石墨烯: 一种用于癌症诊断与治疗的新型纳米试剂[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2014, 46(4): 1-11.
LIU Z M, GUO Z Y. Grapheme oxide: a novel nano-theranostic agent for cancer[J]. Journal of South China Normal University (Natural Science Edition), 2014, 46(4): 1-11.
- [2] ZHU Y W, MURALI S, CAI W W, et al. Graphene and graphene oxide:

- synthesis, properties, and applications[J]. *Adv Mater*, 2010, 22(35): 3906-3924.
- [3] DREYER D R, PARK S, BIELAWSKI C W, et al. The chemistry of graphene oxide[J]. *Chem Soc Rev*, 2010, 39(1): 228-240.
- [4] WANG K, JING R, SONG H, et al. Biocompatibility of graphene oxide[J]. *Nanoscale Res Lett*, 2011, 6(4): 1-8.
- [5] SARI M M. Fluorescein isothiocyanate conjugated graphene oxide for detection of dopamine[J]. *Mater Chem Phys*, 2013, 138(2-3): 843-849.
- [6] 李忠军, 邓跃飞, 庞家栋, 等. 功能化纳米氧化石墨烯微粒对胶质瘤 U251 细胞的靶向光热作用[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2013, 7(24): 235-237.
- LI Z J, DENG Y F, PANG J D, et al. Functionalized nano-graphene oxide particles for glioma U251 cells targeted phototherapy[J]. *Chinese Journal of Clinical Medicine (Electronic Edition)*, 2013, 7(24): 235-237.
- [7] 张龙姣, 张阳德, 申玉璞, 等. 叶酸修饰的氧化石墨烯装载阿霉素的载药性能评价[J]. *材料导报*, 2014, 28(12): 59-62.
- ZHANG L J, ZHANG Y D, SHEN Y P, et al. Evaluation of drug loading property of folic acid modified graphene oxide materials loaded with doxorubicine[J]. *Materials Review*, 2014, 28(12): 59-62.
- [8] LEI Z, RU C, TAO H, et al. Endosomal pH-activatable poly(ethylene oxide)-graft-doxorubicin prodrugs: synthesis, drug release, and biodistribution in tumor-bearing mice[J]. *Biomacromolecules*, 2011, 12(5): 1460-1467.
- [9] 张达, 周非凡, 邢达. 功能化氧化石墨烯的靶向肿瘤成像与光热治疗[J]. *科学通报*, 2013, 58(7): 586-592.
- ZHANG D, ZHOU F F, XING D. Functionalized nano-graphene oxide for cancer targeted imaging and photothermal therapy[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2013, 58(7): 586-592.
- [10] 尤培红, 王明伟, 杨仕平. 纳米氧化石墨烯在肿瘤显像和治疗领域的研究进展[J]. *上海师范大学学报(自然科学版)*, 2015, 44(2): 217-228.
- YOU P H, WANG M W, YANG S P. Research progress in nanographene oxide with tumor imaging and therapy[J]. *Journal of Shanghai Normal University (Natural Science Edition)*, 2015, 44(2): 217-228.
- [11] 张宝红. 白藜芦醇药理研究进展[J]. *现代医院*, 2008, 8(3): 66-68.
- ZHANG B H. Research progress of resveratrol effects[J]. *Modern Hospital*, 2008, 8(3): 66-68.
- [12] 程丽英, 刘树兴. 白藜芦醇研究现状与应用展望[J]. *食品研究与开发*, 2005, 26(1): 25-27.
- CHENG L Y, LIU S X. Study on the status and application of resveratrol[J]. *Food Research and Development*, 2005, 26(1): 25-27.
- [13] 胡著云. 白藜芦醇防治前列腺癌作用机制研究进展[J]. *国际泌尿系统杂志*, 2010, 30(4): 487-491.
- HU Z Y. Research progress on the mechanism of resveratrol in prevention and treatment of prostate cancer[J]. *International Journal of Urology*, 2010, 30(4): 487-491.
- [14] 付丽华, 胡玉红, 孙盛梅, 等. 白藜芦醇抗肿瘤作用的研究进展[J]. *黑龙江医药科学*, 2006, 29(6): 98-100.
- FU L H, HU Y H, SUN S M, et al. Study on the anti-tumor effect of resveratrol[J]. *Heilongjiang Medicine and Pharmacy*, 2006, 29(6): 98-100.
- [15] 刘跃文, 邓顺柳, 谢素原, 等. 氧化石墨烯的还原和烷基化及其储能性能研究[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2014, 53(5): 674-681.
- LIU Y W, DENG S L, XIE S Y, et al. Reduction and alkylation of graphene oxides for energy storage application[J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2014, 53(5): 674-681.
- [16] 徐东, 周宁琳, 沈健. 羧基化氧化石墨烯的血液相容性[J]. *高等学校化学学报*, 2010, 31(12): 2354-2359.
- XU D, ZHOU N L, SHEN J. Hemocompatibility of carboxylic graphene oxide[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2010, 31(12): 2354-2359.
- [17] 吴慧, 吕伟, 邵姣婧, 等. 通过pH值调控的氧化石墨烯片层尺寸、表面化学和电化学性质[J]. *新型炭材料*, 2013, 28(5): 327-335.
- WU H, LÜ W, SHAO J J, et al. pH-dependent size, surface chemistry and electrochemical properties of graphene oxide[J]. *New Carbon Materials*, 2013, 28(5): 327-335.
- [18] 范彦如, 赵宗彬, 万武波, 等. 石墨烯非共价键功能化及应用研究进展[J]. *化工进展*, 2011, 30(7): 1509-1520.
- FAN Y R, ZHAO Z B, WAN W B, et al. Research progress of non-covalent functionalization and applications of graphene[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2011, 30(7): 1509-1520.
- [19] HOLLANDA L M, LOBO A O, LANCELOTTI M, et al. Graphene and carbon nanotube nanocomposite for gene transfection[J]. *Mater Sci Eng C*, 2014, 39(2): 288-298.
- [20] 黄毅, 陈永胜. 石墨烯的功能化及其相关应用[J]. *中国科学: 化学*, 2009, 39(9): 887-896.
- HUANG Y, CHEN Y S. Functionalization of graphene and its related applications[J]. *Science China(Chimica)*, 2009, 39(9): 887-896.

(编辑:陈丽霞)